

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報(A)

昭63-294800

⑥ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑦ 公開 昭和63年(1983)12月1日

C 12 Q 1/70

6807-43

審査請求 未請求 発明の数 3 (全1頁)

⑧ 発明の名称 HTLVウイルス及びHTLVⅡウイルスの検出方法

⑨ 特 願 昭62-255253

⑩ 出 願 昭62(1987)11月25日

⑪ 優先権主張 ⑫ 1986年11月25日 ⑬ 米国(U S) ⑭ 935271

⑮ 発 明 者 ジョン ジョセフ ス アメリカ合衆国、カリフォルニア 94803、ニル ソブラ  
ニンスキ  
⑯ 出 願 人 シタス コーポレイシ アメリカ合衆国、カリフォルニア 94608、ニミリービ  
ョン  
⑰ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名  
最終頁に続く

特許請求の範囲(特許法第17条第1項)

明 細 書

## 1. 発明の名称

HTLVⅠウイルス及びHTLVⅡウイルスの  
検出方法

## 2. 特許請求の範囲

1. HTLVⅠ核酸もしくはHTLVⅡ核酸、又はHTLVⅠ核酸及びHTLVⅡ核酸の両者の核酸物の間で実質的に保存されており、そしてHTLVⅠもしくはHTLVⅡ、又はHTLVⅠ及びHTLVⅡの両者の核酸体中の核酸に特異的な核酸配列の、サンプル中での存在又は不存在を検出又は鑑別するための方法であって、

(a) 前記サンプルを、一対に又は別々に、前記核酸配列の各標のためのオリゴヌクレオチドプライマー、4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェート及び重合用塩基によりハイブリダイゼーション条件下で処理し、前記核酸配列の各標について、検出又は鑑別されるべき核酸配列の各標に対して実質的に相補的である各プライマーのの延長生成物が合成され、一方のプライマーから合成された延長生成物がその相補体から分離された場合に他

方のプライマーの延長生成物のための標型として機能するようにし；

(b) 前記サンプルを酸性条件下で処理して、検出されるべき配列が存在する場合にはプライマー延長生成物をそれらの標型から分離せしめ；

(c) 段階(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーで処理することにより、段階(b)において生成した標型のそれぞれを標型として用いてプライマー延長生成物を合成して、検出されるべき配列が存在すればそれを増幅し；そして

(d) 検出されるべき配列が存在するとすればそれを検出する；

ことを含んで成る方法。

## 2. 段階(d)が、

(1) 前記の増幅された核酸配列とハイブリダイズすることができるラベル化プローブを段階(c)の生成物に添加し；そして

(2) 前記プローブが前記核酸サンプル中の増幅された配列にハイブリダイズするか否かを決定する段階を含んで成る、特許請求の範囲第1項に記載

題の方法。

3. 段階(b)及び(c)を少なくとも1回反復し、そして前記プライマーがHTLV-Iゲノム及びHTLV-IIゲノムのX領域から選択されたものである、特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。

4. 重合のための前記試薬が2.コリ DNAポリメラーゼ、2.コリ DNAポリメラーゼIのIle<sup>1000</sup>断片、逆転写酵素、又は核酸を合成するのに十分な温度に暴露した後に、段階(a)及び(c)の間に反応温度において前記延長生成物を生成するためのその酵素活性を維持している酵素から成る群から選ばれた酵素である、特許請求の範囲第1項〜第3項のいずれか1項に記載の方法。

5. 段階(a)の前に、前記サンプルを該サンプル中に含まれる核酸の量を抽出せしめることができる試薬で処理し、そして該試薬を同時に又は逐次に分離する、特許請求の範囲第1項〜第4項に記載の方法。

6. 段階(2)が、

(1) 段階(d)からのハイブリダイズした混合物

を、前記プローブ中の配列内の部位を認識する制限酵素により消化し；そして

(2) 制限消化物が、検出されるべきHTLV-I及び/又はHTLV-II配列の存在と関連する制限断片を含有するかどうかを検出する；

段階を占めて成る、特許請求の範囲第2項に記載の方法。

7. 段階(1)及び(2)において、HTLV-I及び/又はHTLV-IIウイルスゲノムの配列を有する1又は複数の核酸を含有する陽性対照、及び/又はHTLV-I及び/又はHTLV-IIウイルスゲノムからの配列を有する核酸を含有しない陰性対照を用いる、特許請求の範囲第3項に記載の方法。

8. HTLV-I核酸もしくはHTLV-II核酸又はHTLV-I核酸及びHTLV-II核酸の両者の単離物間で実質的に保存されており、そしてHTLV-IもしくはHTLV-II、又はHTLV-I及びHTLV-IIの両者の単離体中の核酸に特異的な、増幅された核酸配列を含有する組成物であって、

(a) 末端端の形の前記核酸配列を含有するサン

プルを、一緒に又は別々に、該核酸配列の各領域のためのオリゴヌクレオチドプライマー、4種類の異なるスクレオジドトリホスフェート及び重合用試薬によりハイブリダイゼーション条件下で処理し、該スクレオチド配列の各領域について、検出又は変換されるべき核酸配列の各領域に対して実質的に特異的なプライマーの延長生成物が合成され、一方のプライマーから合成された延長生成物がその相補体から分離された場合に他方のプライマーの延長生成物のための標型として機能するようにし；

(b) 前記プライマー延長生成物を、該延長生成物がある上で合成された標型から分離することにより、単鎖分子を生成せしめ；そして

(c) 段階(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーにより処理して、段階(b)において生成した単鎖を標型として使用してプライマー延長生成物が合成されるようにし、こうして前記核酸配列の増幅を得る、ことにより要望したものである該組成物。

9. HTLV-I核酸もしくはHTLV-II核酸、又はHTLV-I

I核酸及びHTLV-II核酸の両者の単離物間で実質的に保存されており、HTLV-IもしくはHTLV-II、又はHTLV-I及びHTLV-IIの両者の単離体中の核酸に特異的な核酸配列のサンプル中での存在又は不存在を検出又は変換するためのキットであって、

(a) 検出されるべき核酸配列の各領域のためのオリゴヌクレオチドプライマー（この1又は複数のプライマーに各特定の核酸配列の各領域に対して実質的に特異的であって、一方のプライマーから合成された延長生成物がその相補体から分離された場合、他方のプライマーの延長生成物の合成のための標型として機能することができる）；及び

(b) 前記核酸配列とハイブリダイズすることができラベル化プローブ；

を占めて成るキット。

10. 重合用試薬、4種類のスクレオジドトリホスフェートのそれぞれ、及び前記プローブと前記配列とのハイブリドを検出するための手段をさらに含んで成る特許請求の範囲第3項に記載のキット。

## 3. 発明の詳細な説明

## (産業上の利用分野)

この発明は、ヒトT細胞白血病ウイルスタイプI及びII(HTLV I及びHTLV II)の保存された複製配列の存在又は不存在の検出のための方法に関する。この発明はまた、このような検出のための、プライマー及びラベルされたハイブリダイゼーションプローブを有するキットに関する。

## (従来の技術)

ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)として知られているT細胞熱帯レトロウイルスの一群に属するT細胞性悪性腫瘍の発病に関与することが知られている。最近3種類のタイプのHTLVが知られている。第一のタイプI(HTLV I)は、日本、カリブ地方及びアフリカにおいて見出されたヒト成人T細胞白血病-リンパ腫(ATLL)に関連する発癌ウイルスである。第二のタイプII(HTLV II)は、ハリー(Hall)細胞白血病のT細胞受容体を有する2人の患者から単離された発癌ウイル

スである。Y. Papovic等、Science, 221:497-500(1984)、及び Rosenblatt, J. D. 等、New Eng. J. of Med., 1985年3月を参照のこと。第3のタイプIII(HTLV III)はレンチウイルスであり、そしてしばしば致命的な目に見え感をもたらし耐性免疫系の正常性を喪失する後天性免疫不全症候群(AIDS)の病原体である。

AIDSのごときHTLV-関連ウイルスに対する抗体を含む血清を測定するための最近の免疫診断試験(Gallo等の米国特許第4,520,113を参照のこと)が潜在的に感度の血液を除去するために血液銀行において使用されている。HTLV等のレトロウイルスを検出するためのモノクローナル抗体を製造するために有用なレトロウイルスポリペプチドについては1985年3月27日に公開されたWO 85/01834(カリフォルニア大学)をも参照のこと。これらのウイルスに有意な量のウイルス粒子を生成することなくDNAコピーとして存在することが出来るため、HTLV I及びII-関連ウイルスを検出するための直接的な免疫的アプローチは、特異的に感

染している無症状の個体の多くにおいて好結果をもたらさない。感染された組織及び血液中のウイルス粒子の数は少ないため(ウイルス休止のため)、感染細胞を受容T細胞系と共に同時培養しない限り、ウイルス粒子又はRNA/DNAを直接検出することは不可能ではないにしても困難である。

1987年7月28日発行のX. Mullisの米国特許第4,683,202は、ラベル化RNA又はDNAハイブリダイゼーションプローブを用いることによる、複製配列の検出を容易にするためにそれを増幅する方法を記載している。この方法においては、プライマーを用いてプライマー延長生成物を得、この生成物を鋳型として用いてスクレオチドの存在下で追加の複製鎖を合成する。上記の特許出願はまた次の様な技術に記載している。すなわち、この方法においては、プローブが目的の配列にハイブリダイズした後制限酵素の添加によりハイブリッドが目的の配列内の部位において開裂され、そして次に制限消化物がラベル化断片について分析される。1987年7月23日発行の米国特許第4,683,194、及び

及びE. Erlich等及びSalki等、Biotechnology, 3:1003-1012(1985)は後者の技術を非常に詳細に記載している。両特許出願は線形赤血芽細胞及びターササミアのごとき遺伝的疾患の検出のためのこの方法の使用を示している。これらの方法、及び複製配列を増幅するための方法にまた、Salki等、Science, 230,1350-1354(1985)にも記載されている。

Leadry等、Clin. Lab. Med. (1985) 5:513-529による総説論文は、ウイルスの検出に使用される既ハイブリダイゼーションの分野を記載している。1986年3月13日に公開されたWO 85/01535、及び1986年3月5日に公開されたEP 173,529はHTLV IIの分子クローニング、及びAIDSを検出するためのプローブとしての核酸クローンの使用を記載している。1986年3月5日に公開されたヨーロッパ特許出願第173,339は、外来微生物による感染を検出するためにDNAプローブを用いる遺伝子分析を開示している。1986年5月25日に公開されたEP 135,444は、細胞溶解中のHTLV IIウイルスの

検出のためのプローブとして使用するための組換えベクトルを開示している。Oncor社は1985年9月に、AIDSウイルスを検出するための放射線標識抗体を開発した旨発表した。

(発明が解決しようとする問題点)

免疫ウイルスHTLV-I及びIIを検出するためのハイブリダイゼーションプローブの使用は、特許的に保護されているがしかしウイルスを生成しない個体又は抗体陰性であるが培養陽性である個体の同定、並びに感染された細胞の検出を、ウイルスの培養を必要としないで可能にするであろう。増幅によるウイルスのウイルス核酸コピー数の増加は感染された個体におけるウイルス核酸の同定を促進するであろう。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、HTLV-I核酸もしくはHTLV-II核酸、又はHTLV-I核酸及びHTLV-II核酸の両者の単離物の間で実質的に保存されており、そしてHTLV-Iもしくは

はHTLV-II、又はHTLV-I及びHTLV-IIの両者の単離体中の核酸に特異的な核酸配列の、サンプル中での存在又は不存在を検出又は監視するための方法であって、

(a) 前記サンプルを、一様に又は別々に、前記核酸配列の各鎖のためのオリゴヌクレオチドプライマー、4種類の異なるヌクレオシドトリホスフェート及び重合用試薬によりハイブリダイゼーション条件下で処理し、該核酸配列の各鎖について、検出又は監視されるべき核酸配列の各鎖に対して実質的に相補的である各プライマーのの延長生成物が合成され、一方のプライマーから合成された延長生成物がその相補体から分離された場合に他方のプライマーの延長生成物のための誘型として機能するようにし；

(b) 前記サンプルを酸性条件下で処理して、検出されるべき配列が存在する場合にはプライマー延長生成物をそれらの誘型から分離せしめ；

(c) 段階(b)の生成物をオリゴヌクレオチドプライマーで処理することにより、段階(b)におい

て生成した単鎖のそれぞれを誘型として用いてプライマー延長生成物を合成して、検出されるべき配列が存在すればそれを増幅し；そして、

(d) 検出されるべき配列が存在するとすればそれを検出する；

ことを含んで成る方法に関する。

生成物を検出するための1つの方法に、段階(c)の生成物に、増幅された核酸配列とハイブリダイズすることができるラベルされたプローブを添加し；そして該プローブが核酸サンプル中の増幅された配列にハイブリダイズしたか否かを決定することによる。1つの態様において、この決定は、

(1) 前記プローブ中の配列内の部位を認識する制限酵素により前記ハイブリダイズした混合物を消化し；そして

(2) この制限消化物がHTLV-I又はHTLV-II配列の存在に関連する制限断片を含有するか否かを決定すること；

により行うことができる。

段階(a)の前に、患者のサンプル中の核酸を抽

出し、抽出された核酸の混合物をサンプルとして実験に処理することができる。さらに、段階(a)において処理するサンプル中のウイルスをあらかじめ培養する必要はない。

他の態様において、この発明は、HTLV-I核酸もしくはHTLV-II核酸、又はHTLV-I核酸及びHTLV-II核酸の両者の単離物の間で実質的に保存されており、HTLV-IもしくはHTLV-II、又はHTLV-I及びHTLV-IIの両者の単離体中の核酸に特異的な核酸配列のサンプル中での存在又は不存在を検出又は監視するためのキットであって、

(a) 検出されるべき核酸配列の各鎖のためのオリゴヌクレオチドプライマー（この1又は複数のプライマーは各特定の核酸配列の各鎖に対して実質的に相補的であって、一方のプライマーから合成された延長生成物がその相補体から分離された場合、他方のプライマーの延長生成物の合成のための誘型として機能することができる）；及び

(b) 前記核酸配列とハイブリダイズすることができるラベル化プローブ；

を含んで成るキットに関する。

好ましくは、このキットはさらに、重合用試薬4種類の異なるスクレオチド、及びプローブと配列とのハイブリッドを検出するための手段を含む。

この発明の試験キットは研究試験、臨床試験、及び他の診断的用途に用いることができる。さらに、このキットはウイルスを培養することなく、感染された細胞をモニターするために使用することができる。これは感染を解明するために種々の感染剤により治療された患者をモニターするのに有用な特徴である。

この発明は、HTLV I 及び HTLV II ウイルスのいずれか又は両者に関連する核酸配列を含有することが疑われるサンプル中の核酸配列を検出し又はモニターするための方法及びキットに関する。HTLV I 及び HTLV II ウイルスの単離体は配列決定されている。増幅されるべき配列は HTLV I 及び/又は II ウイルスに特異的でなければならない。すなわち、HTLV II ウイルス又は非-HTLV I もしくは非-HTLV II ウイルスと反応してはならない。

構造的であるプライマー-延長生成物の合成が誘導される条件下に置かれた場合に、すなわちスクレオチドトリホスフェート及び重合用試薬、例えば DNA ポリメラーゼ、の存在下、適当な温度及び pH において、合成の開始点として機能することができるものである。プライマーは好ましくは、増幅の最大効率のために単鎖であるが、しかし二本鎖であってもよい。二本鎖であれば、プライマーをまず処理してその鎖に分離し、次にこれを用いて延長生成物を構築する。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボスクレオチドである。プライマーは、重合用誘導剤の存在下で延長生成物の合成を開始するために十分な長さを有しなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、塩濃度、スクレオチド組成及びプライマーの由来等、多くの因子に依存するであろう。この発明の目的のため、オリゴスクレオチドプライマーは典型的には15-25又はこれより多くのスクレオチドを含有する。但しさらに少数のスクレオチドを含有することもできる。

(具体的な説明)

HTLV I ウイルスの全ゲノムは Selk 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 3513-3522 (1983) により与えられている。HTLV II ウイルスの全ゲノムは Shiootohno 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 3101-3105 (1985) により与えられている。

検出されるべき配列について適用される「実質的に保存されている」という語は、配列が、検出されるべきウイルス中の核酸に対して、重合用試薬及び4種類のスクレオチドトリホスフェートの存在下で重合を開始するのに十分に相補的でなければならないことを意味する。

用いられるプライマーは、HTLV I 及び/又は II ウイルス中の有数な数の核酸上での重合の特異的な開始を提供するための任意の長さ及び配列のオリゴスクレオチドである。具体的には、この明細書において使用する「プライマー」なる語は、2個以上の、さらに好ましくは3個より多くの、デオキシリボススクレオチド又はリボススクレオチドから成る分子であって、核酸鎖に対して実質的に相

この発明においてプライマーは、増幅されるべき特定の配列の各鎖に対して「実質的に」相補的である様に選択される。このことは、重合用試薬が機能する条件下でプライマーがそれらの対応する鎖とハイブリダイズするために十分に相補的でなければならないこと、すなわち、プライマーが増幅されるべき鎖の配列との十分な相補性を有することによりそれとハイブリダイズし、これによって他の鎖の延長生成物の合成のための模範を構成することを意味する。プライマーは鎖との間に若干のミスマッチを含有することができる。

HTLV I 及び HTLV II ウイルスの間で実質的に保存されている領域の中から増幅されるべき配列を選択することができる。従って、任意の適当な手段でプライマー及びプローブを特定しそして選択することができる。これは、HTLV I 及び HTLV II ウイルスゲノムの公表されている核酸配列の領域を比較することにより手仕事で行うことができる。HTLV I 及び HTLV II ウイルスの X 領域間の相補性が Shiootohno 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**:

6537-6601(1934)により公表されている。他の方法はコンピュータプログラムを用いて配列を比較することである。この目的のため、National Biomedical Research Foundationにより提供される、ドットマトリクスを用いる基本コンピュータプログラムを用いるのが便利である。このプログラムは、ATLV I及びATLV II ウイルスの核酸配列をインプットし、そして塩基対相同性についてウィンドウサイズを決定することを含む。このプログラムはグラフィックを用いて異なる軸上の配列を比較し、そして少なくとも実質的な相同性が存在する場合にドットが現われる。好ましくは、ウィンドウサイズは6塩基より大である。

ゲノムのX領域は、2種類のウイルス中のコード領域間で最も保存されている。これがコード領域間で最も保存されているので、配列を検出するための、これがプローブ及びプライマーを選択するための好ましい候補である。この領域をコードしていないウイルスゲノムの領域を用いて、使用す

べきプライマーの配列を決定することもできる。この発明の目的のため、感度及び特異性を最大にするために、検出されるべき配列は、関連ウイルス間で、特にプローブ及び核酸塩基が使用される場合には制限酵素切断部位において実質的に保存されている、特異的プライミングを可能にするのに十分な長さをも有する配列と相同なものである。

増幅しそしてその後で生成物を検出するために使用される技術に米国特許4,683,201及び4,683,194(前記)；Salki等、*Biotechnology* (前掲)；及びSalki等 *Science* (前掲)に記載されている。一般に、増幅工程に特定の核酸配列を複製するための酵素的連鎖反応を含む、用いられた反応段階の数に対して指数的に核酸配列が複製される。但し、要求される配列の末端が十分に詳細に知られており、それとハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを合成することができること、及び連鎖反応を開始するために少量の配列が入手可能であることが条件となる。一方のプライマーは、(一) 鎖に対して相補

的であり、そして他方は正(+)鎖に対して相補的である。変性された核酸へのプライマーのアニールリング、並びにこれに続く、DNAポリメラーゼ I の大断片(Klenow)のごとき酵素及びヌクレオチドを用いる延長が複合的配列を含有する新しく合成された+及び-鎖をもたらす。これらの新しく合成された配列はさらにプライマーのための模範となるから、変性、プライマーアニールリング及び延長の反復サイクルが、プライマーにより規定される領域の指数的蓄積をもたらす。連鎖反応の生成物は、使用された特定のプライマーの末端に対応する末端を有する別個の核酸デュプレックスである。

次に増幅工程を模式的に示すが、ここでは相補的な鎖(S<sup>+</sup>)及び(S<sup>-</sup>)を含んで成る所望の配列(S)を含有する2本鎖DNAが模範として使用される。第1の及びこれに続く各反応サイクルの間、もとの模範上での各オリゴヌクレオチドプライマーの延長が、プライマーの1つのみにより停止する無延長の新しい ssDNA分子生成物を生成す

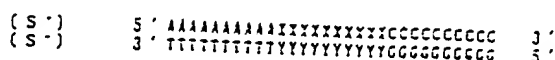
る。今後“長生成物”と称するこれらの生成物は、直接的に蓄積するであろう。すなわち、ある数のサイクルの後に存在する量がサイクル数に比例するであろう。

こうして生成された長生成物に、その後のサイクルの間一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの模範として機能し、そして所望の配列(S<sup>+</sup>)又は(S<sup>-</sup>)の分子を生成するであろう。これらの分子もまた、一方又は他方のオリゴヌクレオチドプライマーの模範として機能してさらに(S<sup>+</sup>)及び(S<sup>-</sup>)を生成し、そしてそれ故に、サイクル数に対して指数的増進での(S)の蓄積をもたらすであろう鎖反応が継続される。

重畳されるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション以外のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションにより生成される副産物は自己懸架的ではなく、そしてそれ故に直接的に蓄積する。

以下余白

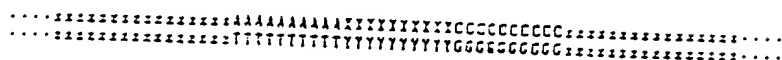
増幅されるべき特異的配列 (S) を次の様に模式的に表すことができる。



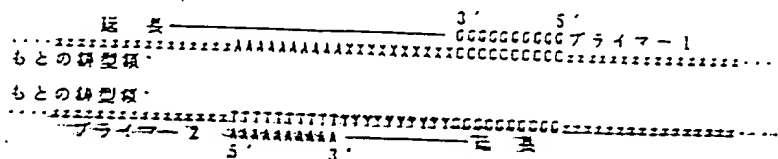
対応するオリゴヌクレオチドプライマーに次の通りであらう。



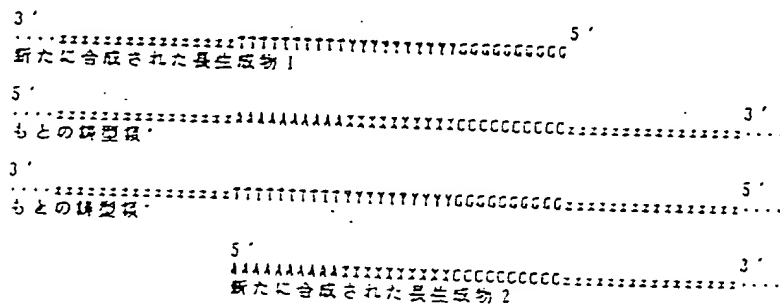
従って、(S) を含有する DNA :



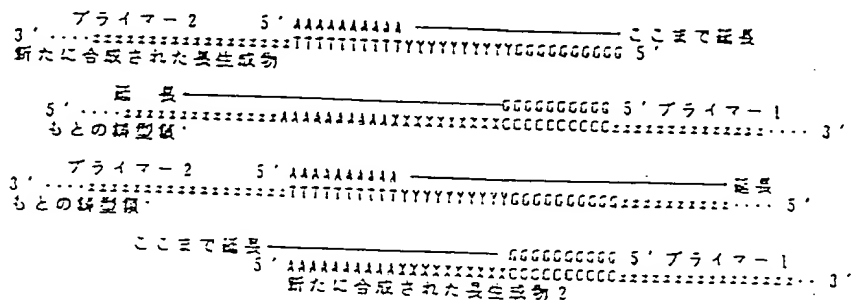
が単鎖に分離され、そしてその単鎖がプライマー 1 及び 2 とハイブリダイズし、4 種類のデオキシリボスクレオシドトリホスフェートの存在下、DNA ポリメラーゼの存在下で次の延長反応が触媒され得る。



生成した 2 つのデュプレックスの不安定化の後、次の生成物が生ずる。



次のサイクルにおいて、これら 4 つの鎖をプライマー 1 及び 2 とハイブリダイズせしめれば、両合用試薬に次の反応を触媒するであらう。





上記4種類のデュアレックスが分類されれば次の値が得る。

5' AAAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCC 3'  
新たに合成された (S')

第1サイクルで合成された長生成物1

3' .....TTTTTTTTTYYYYYYYYGGGGGGGGG 5'  
新たに合成された長生抗体

[illegible]

5' AAAAAAAAAAXXXXXXXXXXXXCCCCCCCCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX... 3'  
新たに合成された最長配列？

3' ..zzzzzzzzzzzzzzzzzzTTTTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGCGGCGGGzzzzzzzzzzzzzzzz ... 5'

3' TTTTTTTTTTYYYYYYYYYGGGGGGGGG S'  
断たに合成された (S')

5' AAAAAAAAAA XXXXX XXXXX CCCCCCCCCC XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX ... 3'  
第1サイクルで合成された多生成物2

1つのプライマーのオリゴヌクレオチド配列で停止する各鎖及び他方の相補鎖は生成することが所望される特定の核酸鎖(S)であることがわかる。

この工程の段階に無限に反復することができ、プライマー 1 及び 2、誘導剤及び存在するスクレオチドによってのみ決定される。もとのスクレオチドは複製されないで、その量に全工程を通じて一定に維持される。長生成物はもとの複製からのみ生成されるのでその量は直線的に増加する。特異的配列の量は指数的に増加する。すなわち、特異的配列に支配的な種となる。これは次の表に示される。この表は、各サイクルの効率を 100% として、 $n$  サイクル後に存在する種の相対量を示す。

以下余自

1-n サイクル後の? 本組の数

<u>サイクル数</u>	<u>経 型</u>	<u>長生動物</u>	<u>特定の配列</u> (S)
0	1	-	-
1	1	1	0
2	1	2	1
3	1	3	4
5	1	5	25
10	1	10	1013
15	1	15	32,752
20	1	20	1,048,555
n	1	n	$(2^n - n - 1)$

結晶として単斜スクレオチドが使用される場合、  
サイクル当り1個のみの長生成物が生成する。

この明細書において使用する場合は、**・** 制限エンドスクレアース、及び、**・** 制限酵素、なる意味、特定のスクレアチド配列において又はその近傍において 2 本鎖 DNA を切断する制限酵素に関する。

この発明のプライマーは次の規準により選択す

る。これは考慮すべき要素であるが、これらのみではなく、又は絶対的なものではない。第一に、プライマーはHTLV I及びHTLV IIゲノムの保存された領域から選択される。X領域がコード領域の内の最も保存されている領域であり、そしてそれ故に最初の研究のためにX領域を選択した。

第二に、プライマーは、試験を導つけると予想されるウイルスゲノムのあらゆる配列、例えば Starck等、*Science*, 227: 538-540 (1985) により公表されているHTLV IIの配列との相同性を欠くものである。

第三に、プライマーは好ましくは増幅される核酸中に二次構造を形成しないものであり、この二次構造は増幅酵素、例えば2.コリ DNAポリメラーゼ、好ましくはKlenow断片と称される DNAポリメラーゼの部分による延長を妨害するであろう。これは、約15重畳までの、好ましくは5〜15重畳のジナチルヌルホキチン(9850)を増幅媒体中に用いることにより、そして/又は増幅温度を30〜40℃に、好ましくは35〜40℃に上昇せしめる

ことにより達成することができる。

第四に、プライマーは好ましくは、約50%のグアニン及びシトシンを含有し、そしてプライマーの3'に多数の連続するアデニン及びチミジン残基を含有しないものである。これにより不安定なハイブリッドをもたらす。最後に、増幅された生成物が制限酵素を用いて検出される場合、プローブは内部の(非-末端)制限部位を有さなければならない。

オリゴヌクレオチドは、例えば、前記のホスホトリエステル塩及びホスホジエステル塩、又はこれらの自動化された方法を用いて調製することができる。1つのこの様な自動化された方法においては、Beaucage等、*Tetrahedron Letters* (1981), 22: 1859-1862により記載されているように、ジエチルホスホラミダイトが出発物質として使用され、そして合成される。修飾された固体支持体上でオリゴヌクレオチドを合成するための1つの方法は米国特許4,458,066に記載されている。生物液から単離されたプライマー (例えば、制限エ

ンズスクレアーゼ精化物)を使用することもできる。

HTLV I及び/又はHTLV IIに関連する特定の核酸配列を含有しているか、又は含有していることが疑われるものである限り、複製された形又は複製されていない形のあらゆる核酸源を出発核酸として使用することができる。すなわち、この方法においては、DNA又はメッセンジャーRNAのごときRNAを使用することができ、このDNA又はRNAは一本鎖でも二本鎖でもよい。RNAが断片として使用される場合、そのRNAをDNAに変性するために最適な酵素及び/又は条件が使用される。さらに、それぞれの鎖を1本ずつ含むDNA-RNAハイブリッドを用いることもできる。これらの核酸の任意の混合物、あるいは同一の又は異なるプライマーを使用する予増幅反応から生成した核酸を使用することもできる。

増幅されるべき特定の核酸配列は大きな分子の一部分であることができ、あるいは個別の分子として存在し、特定の配列が核酸全体を構成してい

てもよい。増幅されるべき配列が最初に純粋な形で存在する必要はなく、例えば複雑な混合物の小部分、例えば全体ヒトDNA中に含有されるウイルス-コード配列の一部分であってもよい。出発核酸は、同一の又は異なる1個より多くの特定の核酸配列を含有することができる。従って、この発明の方法は、1つの特定の核酸配列を多重に複製するためのみならず、同一の又は異なる核酸分子上に位置する1個より多くの特定の核酸配列を同時に増幅するためにも有用である。

核酸配列は、任意の入手源、例えば動物のごとき高等生物からの天然DNA又はRNAから得ることができる。DNA又はRNAは体サンプル、例えば血液、組織材料、例えば絨毛、又は羊水細胞から種々の技法により、例えばHaei:ls等、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (ニューヨーク: コール・ドスプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982) 280-281、により記載されている技法により抽出することができる。

サンプルが不純な、例えば虫糞又は血液である

場合、増幅の前にそれを、サンプルの細胞、液体、組織、ウイルスカプセル又は動物細胞膜を開き、そして核酸の鎖を露出しそして／又は分離するために有効な一定量の試薬により処理することができる。鎖を露出しそして分離するためのこの細胞溶解及び核酸変性段階は、さらに容易に増幅が起ることを可能にするであろう。さらに、サンプルを増幅試薬により処理する前に、サンプル中の HTLV I 及び HTLV II ウイルスを培養する必要がない。サンプルを遠心分離してペフィーコートを得、次にこれをカラムに通して白血球を得ることができる。次に、白血球を処理してそれから核酸を抽出し、増幅用サンプルとして使用することができる。

この発明の方法により、任意の特定の核酸配列を複製することができる。必要なことは、配列の両端の十分な数の塩基が十分に詳細に知られており、所望の配列の真の鎖と、その配列にそう一定の相対位置においてハイブリダイズする2つのオリゴヌクレオチドプライマーであって、それがその鎖型（相補体）から分離された場合に規定され

た長さの核酸への他のプライマーの延長のための鎖型として複製することができるもの、が複製されることである。配列の両端における塩基についての知識が多くなるに従って、鎖的核酸配列のためのプライマーの特異性も大きくなることもでき、そしてそれ故に工程の効率が高くなる。今後使用する場合、プライマーなる語は、特に、増幅されるべき断片の末端配列に関する情報がいく分不明確な場合、複数のプライマーを意味することができると理解すべきである。例えば、核酸配列が蛋白質配列情報から得られる場合、遺伝子コードの読取に基くすべての可能性あるコドン変化を代表する配列を含有するプライマーの集合が各鎖について用いられるであろう。この集合からの1つのプライマーが、増幅されるべき目的の配列の末端と共に実質的に保存されるであろう。

特定の核酸配列が、鎖型としてその配列を含有する核酸を用いることにより複製される。サンプルの鎖的核酸配列が2つの鎖を含有する場合、それを鎖型として使用する前に、別個の段階として、

又はプライマー延長生成物の合成と同時に、鎖型の鎖を分離する必要がある。この鎖分離は、ある適当な変性条件、例えば物理的、化学的又は酵素的手段を用いて達成することができる。この発明において使用する“変性”なる語はこの様な手段のすべてを包含する。核酸の鎖を分離するための1つの物理的方法は、核酸をそれが変性するまで加熱することである。典型的な加熱変性は、約1〜10分間にわたる約80〜105℃の温度を用いる。鎖の分離はまた、ヘリカーゼと称される酵素類、又はヘリカーゼ活性を有しそしてリボATPの存在下で DNA を変性せしめることが知られている酵素 RecA からの1つの酵素により誘導することもできる。ヘリカーゼを用いて核酸の鎖を分離するために適当な反応条件は、Koba Hoffmann-Berlioz, *CSA-Quantitative Biology*, 11: 63 (1973) により記載されており、そして RecA を使用するのための技法は C. Zedding, *Ann. Rev. Genetics*, 16: 405-37 (1982) に記載されている。

増幅されるべき配列を含むものとの核酸配列が単

鎖である場合、その相補体が1又は2個のオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより合成される。適切な1つのプライマーが添加される場合、そのプライマー、重合用試薬及び下記の1種類のヌクレオシドトリホスフェートの存在下でプライマー延長生成物が合成される。この生成物は単鎖核酸と部分的に相補的であり、そして核酸鎖とハイブリダイズして異なる長さのデュプレックスを形成し、このデュプレックスが次に前記のようにして単鎖に分離されて、鎖に相補的な2つの分離された単鎖を生成するであろう。あるいは、2つの適切なプライマーを単鎖核酸に加え、そして反応を行うことができる。

オリゴヌクレオチドが増幅されるべき配列を構成する場合、生成するプライマー延長生成物もその核酸の鎖と完全に又は実質的に完全に相補的であり、そしてそれとハイブリダイズして同じ長さの鎖のデュプレックスを形成し、これが鎖分子に分離されるであろう。

核酸がらうと二本鎖であろうと単鎖であろう

と、核酸の相補的な2つの鎖が分離された場合、それらの鎖に追加の核酸鎖の合成のための鋳型として使用され得る状態となる。この合成は、鋳型へのプライマーのハイブリダイゼーションが起ることを許容する条件下で行われる。一般にこれには、緩衝化水溶液中で、好ましくは1~9のpHにおいて、最も好ましくはおよそpH8において起る。好ましくは、一定モル過剰の(ゲノム核酸の場合には通常、プライマー：鋳型が10<sup>4</sup>:1)2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを、分離された鋳型鎖を含有する緩衝液に加える。しかしながら、この発明の方法が診断用に用いられる場合には相補的鎖の量に知られず、従って相補鎖の量に対するプライマーの量は正確には決定され得ないと理解される。しかしながら実際には、増幅されるべき配列が複雑な長い核酸鎖の混合物中に含まれる場合、添加されるプライマーの量は相補鎖(鋳型)の量に比べてモル過剰であろう。工程の効率を改善するためには大モル過剰が好ましい。

デオキシリボヌクレオシドトリホスフェート

ことができ、これに鋳型が包含される。この目的のために適当な鋳型には、例えば2.コリ DNAポリメラーゼ1、2.コリ DNAポリメラーゼ1の Xba<sup>+</sup>断片、T4 DNAポリメラーゼ、他の入手可能な DNAポリメラーゼ、ポリメラーゼヌーティン、逆転写酵素、及び他の酵素、例えば熱安定性酵素(すなわち、変性を生じさせるために十分に上昇した温度に暴露した後にはプライマー延長を行う酵素)が含まれ、これらに適切な塩基でのヌクレオチドの結合を促進し、各核酸鎖に相補的なプライマー延長生成物を生成せしめるであろう。一般に、合成は各プライマーの3'末端から始まりそして鋳型鎖にそって合成が停止するまで5'方向に進行し、異なる長さの分子を生成する。しかしながら、上記の同じ方法を用いて、5'末端において合成を開始しそして他の方向に進行せしめる重合同試薬も存在し得る。

新たに合成された鎖及びその相補的核酸鎖は、複合配列が存在すれば前記のハイブリダイゼーション条件下で二本鎖分子を形成し、そしてこのハ

ybrid, dCTP, dGTP及びTTP もまた、プライマーとは別個に又はこれと一緒に、適当な重合同混合物中に添加され、そして得られた溶液が約90~100℃にて、約1~10分間、好ましくは1~4分間加熱される。この加熱期間の後、溶液を室温に冷却する。この温度はプライマーハイブリダイゼーションのために好ましい。この冷却された混合物に、プライマー延長反応を行うための適当な試薬(この明細書において重合同試薬と称する)を添加し、そして当業界において知られている条件下で反応を行う。重合同試薬は、もしそれが熱安定性であれば、他の試薬と一緒に添加することもある。この合成反応は室温から、重合同試薬がそれ以上では機能しなくなる温度までにおいて起こることができる。すなわち、例えば、DNAポリメラーゼが試薬として使用される場合、温度は一般に約40℃より高くはない。最も便利には、反応は室温にて行う。

重合同試薬にプライマー延長生成物の合成を達成するために機能する任意の化合物又は系である。

イブリドがこの方法の次の段階において使用される。次の段階において、ハイブリダイゼーション条件下で処理されたサンプルを、前記のいずれかの方法を用いて変性条件にかけ、複合配列が存在するとすれば単鎖分子を得る。

新しい核酸が単鎖分子上に合成される。前記の条件下に反応が進行することが必要であれば、追加の重合同試薬、ヌクレオチド及びプライマーを添加することができる。やはり、合成は各オリゴヌクレオチドの一端から開始されそして鋳型の単鎖にそって進行し、追加の核酸を生成するであろう。この段階の後、反応生成物の半分は2つのプライマーにより挟まれた特定の核酸配列から成るであろう。

検出のために必要な程度に複合核酸配列を増幅するために必要な回数だけ、変性及び延長生成物合成の段階を反復する。さらに詳細に説明するように、生成された特定の核酸配列の量が指数的に蓄積するであろう。

最初の核酸又は核酸の混合物から1種類より多

くの特定の核酸配列を調製することが望まれる場合には、適切な数の異なるオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。例えば、2種類の異なる特定の核酸配列が調製されるべき場合、4種類のプライマーが使用される。2つのプライマーは特定の核酸配列の1つに特異的であり、他の2つのプライマーは第二の特定の核酸配列に特異的である。このようにして、2種類の異なる特定の配列を、この発明の方法により相殺的に調製することができる。

この発明は、各段階の後に新たな試薬を加えながら段階的に、すべての試薬を最初の段階で加えて同時に、あるいは所定数の段階の後に新たな試薬を加えながら半ば段階的且つ半ば同時的に行うことができる。熱感受性酵素の場合のように、滅活用試薬を不活性化するのであるが変性方法、例えば熱を用いる場合、各段階段階の後に試薬を更新する必要がある。相殺段階に酵素的手段を用いる場合、同時的方法を用いることができる。同時的方法においては、反応混合物は、所望の配列を含有する核酸鎖に加えて、相殺酵素（例え

ば、ヘリカーゼ）、核酸分解酵素のための適切なエネルギー源、例えばATP、4種類のヌクレオシドトリホスフェート、その過剰のオリゴヌクレオチドプライマー、及び滅活用試薬、例えば3:1のコリDNAポリメラーゼIのXbaI断片を含有することができる。

同時的方法において変性のために加熱が使用される場合、核酸が平衡状態の単鎖及び二本鎖から成る温度である上昇した温度、例えば試薬に依存して50℃〜105℃において殺菌するであろう熱安定性試薬、例えば熱安定性ポリメラーゼが用いられる。長さの短い核酸のために約40℃〜50℃の低い温度を用いることができる。上限温度に、酵素が分解する温度、又はそれより高温でプライマーハイブリダイゼーションが十分なレベルで起らない温度に依存するであろう。この様な熱安定性酵素は例えばJ.S. Saladie等、*Stockholm*, 45, 644-651 (1980) により記載されている。この定温反応が継続するためには、プライマーはお互の6〜8塩基対以内にそれらの3'末端を有する。

この方法の各段階は、すべての試薬が最初に存在するにもかかわらず逐次的に生ずる。必要に応じて追加の材料を添加することができる。所望の量の特定の核酸配列を生じさせるのに適切な時間が経過した後、既知の方法で酵素を不活性化することにより、又は反応成分を分離することにより反応を停止させることができる。

温度サイクル反応を用いて増幅を行うこともでき、この場合熱安定性酵素を用いて延長、アニーリング及び変性を行うために温度を次第に上昇せしめる。

この発明の方法に連続的に行うことができる。自動化された方法の具体例においては、変性領域、試薬添加領域、及び反応領域を通して反応を循環することができる。他の形態においては、プライマー-産物生成物の合成のために使用される酵素をカラム中に固定化することができる。他の反応成分はポンプによりカラム及び加熱コイルを直列的に通して連続的に循環せしめ、そして酵素を不活性化することなく繰り返し変性せしめることがで

きる。

増幅された生成物は、放射能プローブを用いることなくサザンブロットによってそれを分析することにより、検出することができる。この様な方法においては、例えば、非常に低レベルのHTLV I及び/又はIIを含有する末梢血リンパ球からのDNAの小サンプルを増幅し、そしてサザンブロット法により分析する。高レベルの増幅されたシグナルにより非放射能プローブの使用が容易になる。検出のための他の方法は、増幅された核酸配列とハイブリダイズすることができるラベルされたプローブを用い、そして該プローブがハイブリダイズしたかを決定することを含む。この様なプローブはHTLV I及び/又はHTLV II ウイルスのゲノムからの実質的に保存された核酸配列を必然的に含有し、そしてプライマー及び増幅される配列について前記したようにして選択される。好ましくはHTLV I及び/又はHTLV II のX領域から選択される。

1つのこの様なプローブ法は米国特許

4,683,194(前掲)に記載されている様なオリゴマー制限酵素法を含む、この方法においては、増幅された核酸を変性せしめ、そして複合配列(プライマーにより含有される特定の保存された領域を含む)に特異的にハイブリダイズし且つ注目の少なくとも1つの制限部位を含むラベルされたオリゴヌクレオチドに溶液中でハイブリダイズせしめる。複合及びプローブ間に形成されたデュプレックスが制限部位を再構成し、そして制限酵素、例えば Sel I、Pvu II、又は Hinf I で開裂された場合、ゲル電気泳動により全長プローブから容易に分離され得るラベルされた制限断片を放出する。次に、得られたゲルをオートラジオグラフィにかける。この方法による増幅された生成物の分析は迅速である。すなわち数時間で結果が得られる。好ましくは、プローブは30~45塩基の長さを有し、そしてラベルされている。また、制限酵素として Sel I、Pvu II、又は Hinf I が好ましい。

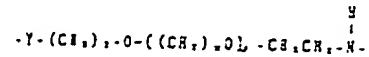
増幅された生成物を分析するために使用することができる他の方法はドットプロット法である。

で置換されるアソラレン成分に連結される。アソラレン成分は、Coorego-Tabbe 等、Biochim. Biophys. Acta, 597(1982) 1-5 により記載されているように、"ギャップ"を有するサークル"プローブ"に入り込みそして増幅し、ここでギャップを有するサークルの単独ハイブリダイゼーション領域にプライマー間に含まれる領域を含む。このビオチン化及びドットプロット法の詳細は、米国特許他4,582,789 及び他4,517,251 にさらに詳細に記載されている。ビオチン化プローブは放射性同位元素の使用の必要性を排除する。

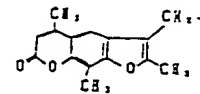
別の方法として、プローブをまず酸に、必要であればアルカリでハイブリダイゼーション条件下でスポットし、そして次にこの前処理された膜に増幅された生成物を、"逆"ドットプロット方式で、ハイブリダイゼーション条件下で加える。

このドットプロット法は前記のオリゴマー制限酵素法に比べて時間を要する。膜をまずアルカリでハイブリダイズせしめ、そして次にプローブとハイブリダイズさせなければならないからである。しか

この方法においては、増幅されたサンプルを膜に直接スポットし、そしてラベル化プローブとハイブリダイズせしめる。このラベルは、分光法、光化学法、又は生化学的、免疫化学的もしくは化学的手段により検出することができる。この例には酵素、例えばアルカリ性ホスファターゼ、放射性ラベル、例えば  $^{32}P$ 、蛍光ラベル、又はビオチンが含まれる。1つの態様においては、このプローブはビオチン化プローブであって、ビオチンが次の式：



(式中、YはO、NH又はN-CHOであり、Xは1~4の数であり、そしてYは2~4の数である)で置換されるスパーサーアームにより連結されている。このスパーサーアームは、次の式：



しながら、急速に変異するウイルスについては限定された塩基のミスマッチを含有する配列が適切なハイブリダイゼーション条件下でなお検出されるという利点をドットプロット法は有し、これに對してオリゴマー制限酵素法においては、制限部位の破壊をもたらす変異を有するウイルスはウイルスの可変性の故に検出されないであろう。

この発明はまた、使用される各プライマー及びプローブの容器を有する包装された多容器ユニットを有するキットに関する。このキットはまた、プライマー-延長生成物を合成するための混合液は、例えど酵素の容器、4種類のヌクレオシドトリホスフェートのそれぞれのための容器、及びラベルを検出する手段(ラベルがビオチンの場合には、例えどアビジン-酵素複合体)の容器を含有することができる。さらに、キットはまた、STLV I 及び/又は HTLV II ウイルスゲノムの配列を有する1又は複数の核酸を含有する陽性対照の容器、及び/又はこの様な核酸を含まない陰性対照の容器を有することができる。さらに、キットは、複合配

列を含有する核酸をプローブの配列中に含まれる部位において固定することができる各種種類の容器を有することができる。

次に、例によりこの発明の種々の態様を示すが、この発明の範囲がこれらに限定されるものではない。この例において、特にことわらない限り、すべての部及び外は固体については重量により、そして液体については容量による。濃度はで示す。

#### 例1

増殖されるべき目的配列は、Regional Oncology Center, SUNY Upstate Medical Center, シラカス、ニューヨーク 13210のBernard Polesz博士から入手した11個の印を付されたONAサンプル、19(8X, 342, 367, 361, 368H, 207, 307, 3088, 323, 326及び340)中に含まれていた。プライマー及びプローブは、Shimotokuno等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6657-6661 (1984)により同定されたHTLV Iウイルス及びわずかなミスマッチを伴うHTLV IウイルスのX領域を用いて選択した。

まず、標識を付されたサンプルはPolesz博士によりインターロイキンの存在下で培養された。次に、下記の方法によりサンプルからONAを抽出した。

1.  $1 \sim 2 \times 10^6$  個の培養細胞を試管中で、20 mlのドデシル硫酸ナトリウム細胞溶解液(1% SDS, 150 mM NaCl, 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA)により溶解した。

2. 試験管当り5 ml/μlのプロテイナーゼK溶液(100 μl)を加え、そして37℃にて一夜インキュベートした。

3. ONAをフェノール、及びCNCI、イソアミルアルコールにより逐次抽出し、次にエタノールで沈澱せしめた。

4. ONAをガラス棒に巻き取り、そして1×TE緩衝液(T10 mM Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.5)中に再懸濁し、そして1×TE緩衝液に対して十分に透析した。

#### 1. プライマーの合成

それぞれSX43及びSX44と称する2種類のオリゴ

デオキシリボスクレオチドプライマー:

5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3' (SX43)

5'-GAGCCGATAACGGCTCCATCG-3' (SX44)

を前記の方法により合成した。

#### A. 自動合成法

Beaucage及びCaruthers (Tetrahedron Letters (1981) 22: 1859-1862) に従って合成されたジニチルホスホラミダインを次々に、ピオサーチSAM-1を用いて、ヌクレオチドで誘導体化された調節された孔のガラス支持体に結合せしめた。この方法は、ジクロロメタン中トリクロロ酢酸によるトリチル化、活性化陽子供与体としてベンゾトリアゾールを用いる縮合、並びにテトラヒドロフラン及びピリジン中無水酢酸及びジメチルアミノピリジンを用いるキャッピングを含む。サイクル時間は約30分であった。各段階の収量に実質的に定量的であり、そしてトリチル化の間に放出されるジメトキシトリチルアルコールの収量及び分光測定により決定された。

以下余白

#### B. オリゴデオキシリボスクレオチドの脱保護及び精製方法

固体支持体をカラムから取り出し、そして1 mlの塩水酸化したアンモニウムに室温にて4時間密封チューブ中で暴露した。次に支持体を透過により除去し、そして部分的に保護されたオリゴデオキシスクレオチドを含有する溶液を5時間55℃にした。アンモニウムを除去し、そして残渣を分取用ポリアクリルアミドゲルに適用した。30 V/cmにて90分間電気泳動を行い、その後で生成物を含有するバンドを蛍光プレートでのUVシャドウイングにより同定した。バンドを切り出し、そして1 mlの蒸留水で4℃にて一夜抽出した。この溶液をAlltech RP18 カラムに適用し、そして1%酢酸アンモニウム (pH 5.0) 緩衝液中アセトニトリルの7~13%のグラジエントにより抽出した。抽出液を260 nmでのUV吸収によりモニターし、そして該当する画分を集め、一定容量中でのUV吸収により定量化し、そして真空遠心機中至温にて乾涸した。

以下余白

## C. オリゴデオキシリボスクレオチドの特徴付け

精製されたオリゴスクレオチドの試験アリコートボリスクレオチドキナーゼ及び $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATPを用いて $^{32}\text{P}$ でラベルした。ラベルされた化合物を、50 V/cmにて45分間の電気泳動の後14~20%ポリアクリルアミドゲルのオートラジオグラフィにより試験した。この方法により分子量が確認される。ヘビ毒ジエステラーゼ及び細菌アルカリ性ホスファターゼの使用によるオリゴデオキシリボスクレオチドのヌクレオシドへの消化、並びにこれに続く、逆相HPLCカラム及び10%アセトニトリル、1%酢酸アンモニウム移動相を用いる前記ヌクレオシドの分離及び容量により塩基組成を決定した。

## D. 塩基反応

Polex博士からの11個の標識を付された DNA サンプルのそれぞれからの DNA 1  $\mu\text{g}$ を、10mM Tris-HCl (pH 7.5)、50mM 塩化ナトリウム及び10mM 塩化マグネシウムから成る緩衝液であって100 $\mu\text{mole}$ の

プライマー-SX43、100 $\mu\text{mole}$ のプライマー-SX44並びに150nM ずつのdATP、dCTP、dGTP及びTTPを含有するもの100 $\mu\text{M}$ に加えた。

得られた溶液を10分間100°Cに加熱し、そして2分間室温に冷却し、次にE. coli DNAポリメラーゼのKlenow断片1ユニットを含有する2 $\mu\text{L}$ を加えた。反応を室温にて2分間進行せしめ、次に95°Cにて2分間加熱することにより酵素を不活性化した。段階当り2分間ずつの変性、プライマーのアニールング、及びKlenowにより延長、並びにポリメラーゼの添加を19回反復した。

## E. オリゴデオキシリボスクレオチドアプローブの合成及びリン酸化

次の配列:

5'-ACGCCCTACTGGCCACCTGTCCAGACATCAGATCACCTG-3'

( $\gamma$ -ラベルを要せず)を有するラベル化 DNA

プローブ SX45を、1. において記載した方法に従って合成した。10 $\mu\text{mole}$ のプローブを4ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び10 $\mu\text{mole}$ の $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP(約7200 Ci/ $\mu\text{mole}$ )と、70mM Tris(pH

7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>、1.5mM スペルミン及び2.5mM ジチオスレイトールを含有する40 $\mu\text{L}$ の反応容量中で37°Cにて90分間接触せしめることによりラベルした。次に、全容量を25mM EDTAにより100 $\mu\text{L}$ に調整し、そしてアリコートを取り、ATC法により比活性を決定した。ラベルされたプローブをSpeed-vacを用いて濃縮し、そしてTris-酢酸-EDTA (TBE) 緩衝液(89mM Tris, 89mM 酢酸、2.5mM EDTA, pH 8.3)中1.8%ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド: BIS=19:1)上での電気泳動により500V/hrで精製した。オートラジオグラフィにより位置を決定した後、ラベル化プローブを含有するゲルの部分を切り出し、破砕し、そして0.2 $\mu\text{L}$ のTBE緩衝液に4°Cにて一夜溶出した。反応生成物のTCA法による比活性が2 Ci/ $\mu\text{mole}$ でありそして最終濃度が20 $\mu\text{mole}/\mu\text{L}$ であることを示した。

以下余白

## F. 増幅されたゲノムDNAのプローブとのハイブリダイゼーション及びBgl Iによる消化

## A. 増幅中の検出

10 $\mu\text{L}$ の増幅されたDNA(71ngのゲノムDNAの増幅同等物を含有する)を1.5 $\mu\text{L}$ のマイクロフュージチューブに分配し、そして10 $\mu\text{L}$ のTE緩衝液により30 $\mu\text{L}$ の最終容量とした。サンプルを95°Cにて10分間変性した。0.02 $\mu\text{mole}$ のSX45プローブを含有する0.6M NaCl 10 $\mu\text{L}$ をチューブに加え、ゆっくり混合し、そして紅袖を置換し、そしてすぐに55°Cでのヒートブロックに移して1時間置いた。10 $\mu\text{L}$ の50mM MgCl<sub>2</sub>及び1 $\mu\text{L}$ のBgl I (8ユニット)を加え、そして再アニールしたDNAを55°Cにて30分間消化した。4 $\mu\text{L}$ の75mM EDTA及び5 $\mu\text{L}$ の追跡色素を加えて最終容量60 $\mu\text{L}$ とした。板液を0.2 $\mu\text{L}$ のクロロホルムで抽出し、そして13 $\mu\text{L}$ の反応混合物(=15 ngのゲノムDNA)をBoehringer SE 200装置中の30%ポリアクリルアミドミニゲル(19:1)上に負荷した。ゲルを約300Vにて1時間、ブロムフェノールブルー色素が原点から



1.0 cm泳動するまで電気泳動した。ゲルの先端1.5 cmを除去し、そして残りのゲルを少なくとも一夜、2個の強化スクリーンを用いて-70℃にて暴露した。

### 3. ドットプロットによる検出

増幅された DNA を NaOH と  $M_{n}$ , EDTA との緩衝液に加えて、最終濃度を 400 mM NaOH 及び 25 mM  $M_{n}$ , EDTA とし、そして最終容量を 200  $\mu$ l とした。

イオン性の膜を水中で濡し、そして Bio-Rad イムノプロット真空装置に入れた。次に真空を引き、装置を平衡にし、そして前記の DNA サンプルを膜に負荷した。膜を 20 $\times$ SSPE で洗浄した。SSPE に NaCl、リン酸ナトリウム、EDTA 及び NaOH から成る緩衝液である。次に、膜を取り出し、そして 20 $\times$ SSPE に入れて 2~5 分間浸漬した。次に、~~膜を乾燥し、UV 光に 5 分間暴露して DNA を膜に固定せしめた。~~

次に、膜を 5  $\mu$ l のフレハイブリダイゼーション溶液 (3 $\times$ SSPE、5 $\times$ デンハート溶液、0.5%  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-デシル硫酸ナトリウム (SDS)、3.0%ホルムアミ

D、ガラス蒸留水により 1.0  $\mu$ l にする) に入れ 42℃にて 30 分間浸漬した。次に、フレハイブリダイゼーション溶液を絞り取り、そして 5  $\mu$ l のハイブリダイゼーション溶液 (フレハイブリダイゼーション溶液に 0.5  $\mu$ mol の SK45 を添加したもの) を加えた。42℃にて 1 時間、浸漬しながらインキュベーションを行った。

ハイブリダイゼーションの後、2 $\times$ SSPE、0.1% SDS 中で 15 分間ずつ 2 回、室温にて浸漬しながら洗浄した。次に、これを 0.2 $\times$ SSPE、0.1% SDS により 50℃にて 5 分間、浸漬しながら洗浄した。膜を乾燥し、そしてフィルムに暴露した。

### V. 結果の検討

溶液中及び膜上での両方の検出のオートラジオグラフは、サンプル 342 (HTLV I)、367 (HTLV I)、361 (HTLV I)、307 (HTLV I)、3088 (HTLV I)、323 (HTLV II) 及び 326 (HTLV I) 中のみ HTLV I 及び II DNA 配列が存在することを示した。これらのサンプルのすべてが HTLV I 又は HTLV II 陽性 DNA であることが後で見出された。他の 4 個のサンプル

は、1948X-白血病患者 (ウイルス単離されない) からの DNA、207-攻撃的白血病患者 (皮膚包含) からの DNA、340-攻撃的白血病患者 (207 と異なる) からのもの、及び 3688-HTLV II であった。

従って、使用したプライマーは DNA を増幅することが可能であり、プローブが配列を正確に検出することを可能にした。

37℃にて 1.0% DMSO の存在下での増幅 (二次構造の形成を最少にする) もまた HTLV I 及び II サンプルを陽性サンプルとして示した。

### 例 2

#### HTLV I

pol 領域 3365-3483 を増幅する HTLV I - 特異的プライマーを用いて、例 1 の増幅/ハイブリダイゼーション/消化実験を行った。これらのプライマーは次の 2 種類であった。

5'-CTTCACAGTCTCTACTGTC-3' (SK54)

5'-CGGCAGTTCTGTGACAGGG-3' (SK55)

下記のプローブ SK56 を制限酵素 *Pvu* II と共に使用した。

5'-CGGCAGTCTGCACTAATGATTGCACTGAGAACGAT-3' (SK56)

オートラジオグラフは、HTLV I DNA 配列が、~~改~~で HTLV I 陽性 DNA として同定されたサンプル中にのみ存在することを示した。

#### HTLV II

pol 領域 4193-4300 を増幅する HTLV II - 特異的プライマーを用いて、例 1 の増幅/ハイブリダイゼーション/消化実験を行った。次のプローブを使用した。

5'-ATCTAGCTGCAACCATGTCGG-3' (SK58)

5'-TGACGGGGAACAGGGGACCT-3' (SK59)

下記のプローブ SK60 を制限酵素 *Eco* RI と共に使用した。

5'-TAACGGCACTGTGTATTGATTGCAAGCTGCAATTGGGTC-3' (SK60)

オートラジオグラフは、HTLV II DNA 配列が、~~改~~で HTLV II 陽性 DNA として同定されたサンプル 323 中にのみ存在することを示した。

以下空白

## 第1頁の続き

- ③発明者 シャーレイ イー ウ  
オク  
④発明者 ベルナード ボイニス  
⑤出願人 ザ リサーチ ファウ  
ンデーション オブ  
ステイト ユニバーシ  
ティ オブ ニューヨ  
ーク  
アメリカ合衆国、カリフォルニア 94563, ナン ラミ  
ン, コーモンド サークル 611  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 13159, タリー, ロング  
ロード, ボックス 49, アールティアー, 3  
アメリカ合衆国, ニューヨーク 12246, オールバニ, ス  
テイト ユニバーシティ プラザ (寄地なし)

## 手続補正書 (方式)

昭和63年3月17日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示  
昭和62年特許第296253号  
2. 発明の名称  
ITLY I ウイルス及びITLY II ウイルスの検出方法  
3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人

名称 シタス コーポレーション

(外1名)

4. 代理人  
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号  
野光虎ノ門ビル 電話 504-0721  
氏名 弁護士 (5579) 青木 朗  
(外4名)

5. 補正命令の日付  
昭和63年2月23日 (発注日)

## 6. 補正の対象

- ① 願書の「出願人の代表者」の欄  
② 委任状  
③ 明細書

## 7. 補正の内容

- ①④ 訂正の通り  
② 明細書の添書 (内容に変更なし)

## 8. 添付書類の目録

- ① 訂正願書 1通  
② 委任状及び訳文 各2通  
③ 添書明細書 1通